

**PCT**WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification: <b>A61K 35/78, A01N 65/00</b>	<b>A1</b>	(11) International Publication Number: <b>WO 97/30718</b> (43) International Publication Date: <b>28 August 1997 (28.08.97)</b>
(21) International Application Number: <b>PCT/AU97/00092</b> (22) International Filing Date: <b>20 February 1997 (20.02.97)</b> (30) Priority Data: <b>PN 8156 20 February 1996 (20.02.96) AU</b> (71)(72) Applicant and Inventor: <b>STACEY, Thomas, Keith</b> <b>[AU/AU]; 53 Curl Curl Parade, Harbord, NSW 2096 (AU).</b> (74) Agent: <b>PHILLIPS ORMONDE &amp; FITZPATRICK; 367 Collins</b> <b>Street, Melbourne, VIC 3000 (AU).</b>	(81) Designated States: <b>AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,</b> <b>BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE,</b> <b>HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,</b> <b>LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL,</b> <b>PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA,</b> <b>UG, US, UZ, VN, YU, ARIPO patent (KE, LS, MW, SD,</b> <b>SZ, UG), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,</b> <b>TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI,</b> <b>FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent</b> <b>(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD,</b> <b>TG).</b>  <b>Published</b> <i>With international search report.</i>	

(54) Title: **ANTIMICROBIAL COMPOSITION**

## (57) Abstract

An antimicrobial composition including the aqueous fraction collected following the steam distillation of the foliage of melaleuca plants and a process for preparing the antimicrobial composition including: a) supplying foliage from melaleuca (linerafolia) and/or melaleuca (alternafolia) plants to a sealed vessel; b) passing steam through the foliage in the sealed vessel to extract oil therefrom and collecting the steam thereafter; c) cooling the steam to form an oil phase and an aqueous antimicrobial composition, and d) separating the oil phase from the antimicrobial composition.

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AM	Armenia	GB	United Kingdom	MW	Malawi
AT	Austria	GE	Georgia	MX	Mexico
AU	Australia	GN	Guinea	NE	Niger
BB	Barbados	GR	Greece	NL	Netherlands
BE	Belgium	HU	Hungary	NO	Norway
BF	Burkina Faso	IE	Ireland	NZ	New Zealand
BG	Bulgaria	IT	Italy	PL	Poland
BJ	Benin	JP	Japan	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Romania
BY	Belarus	KG	Kyrgyzstan	RU	Russian Federation
CA	Canada	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CF	Central African Republic	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapore
CH	Switzerland	LJ	Liechtenstein	SI	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovakia
CM	Cameroon	LR	Liberia	SN	Senegal
CN	China	LT	Lithuania	SZ	Swaziland
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TD	Chad
CZ	Czech Republic	LV	Latvia	TG	Togo
DE	Germany	MC	Monaco	TJ	Tajikistan
DK	Denmark	MD	Republic of Moldova	TT	Trinidad and Tobago
EE	Estonia	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Spain	ML	Mali	UG	Uganda
FI	Finland	MN	Mongolia	US	United States of America
FR	France	MR	Mauritania	UZ	Uzbekistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

ANTIMICROBIAL COMPOSITION

The present invention relates to a process for preparing antimicrobial compositions, to the antimicrobial compositions so prepared and to methods of  
5 using the antimicrobial compositions.

BACKGROUND

An antimicrobial composition is a composition which includes natural or artificial  
10 agents which prevent the growth of or kill microorganisms.

There are many different types of antimicrobial compositions that are known. Some compositions may only be effective to prevent the growth of or kill a limited number or type of microorganisms. However, there are also other well  
15 known antimicrobial composition which can prevent the growth of or kill a wide range of types of microorganisms.

There are also a large range of different processes for preparing antimicrobial compositions. Some of these processes are very complicated and some are  
20 very simple.

Applicant has, however, developed a new process for the preparation of an antimicrobial composition.

25 Applicant has now surprisingly found that a by-product formed during the extraction of oil from the foliage of melaleuca plants is a very effective antimicrobial composition. It has previously been known that tea tree oil (ie oil extracted from melaleuca plants) is effective as an antibactericide. However, the present invention does not relate to this oil. The present invention relates to  
30 the composition remaining after the oil component produced from the distillation of melaleuca plants has been extracted. This composition has unexpectedly

- and surprisingly been found to have a very effective antimicrobial activity at levels far greater than tea tree oil.

### SUMMARY

5

According to one aspect of the present invention there is provided a process for preparing an antimicrobial composition including:

- 10 a) supplying foliage from melaleuca (linerafolia) and/or melaleuca (alternafolia) plants to a sealed vessel,
- b) passing steam through the foliage in the sealed vessel to extract oil therefrom and collecting the steam thereafter,
- 15 c) cooling the steam to form an oil phase and an aqueous antimicrobial composition, and
- d) separating the oil phase from the antimicrobial composition.

- 20 According to another aspect of the invention there is provided an antimicrobial composition including the aqueous fraction collected following the steam distillation of the foliage of melaleuca plants.

- 25 Further according to the invention there is provided a method of treating a viral, fungal or bacterial infection which includes administering an effective amount of the antimicrobial composition of the invention to the site of the infection.

### DETAILED DESCRIPTION

- 30 The process for preparing the antimicrobial composition may be conducted in any suitable apparatus. In a preferred embodiment the process is conducted in a standard steam distillation apparatus.

The quantity of foliage supplied in step a) of the process will depend on the size of the sealed vessel. The sealed vessel may have a 1600 litre capacity. However, vessels up to and above 5 tonne (5000 litres) may be used. If a sealed vessel of 1600 litre capacity is used in the process, then there is usually  
5 about 0.2 to 0.5 tonne of foliage supplied to the vessel.

The sealed vessel used in the process of the invention may be of any suitable design and construction such that the foliage can be contained in a steam tight environment. Further, the sealed vessel must be designed such that steam can  
10 pass through the foliage.

The steam may be generated within the sealed vessel. Alternatively, the sealed vessel may include a steam inlet and the steam may be supplied to the inside of the vessel from a boiler or steam generator which is connected to th  
15 steam inlet. The steam inlet is preferably positioned such that the steam may enter the vessel and pass evenly through all of the foliage supplied thereto. In most cases the steam inlet will be positioned in the base or a lower side wall of the sealed vessel.

20 The sealed vessel may also include a grid adapted to hold the foliage above the base of the vessel to enable an even flow of steam to pass through the foliage. The optimum position of the grid above the base of the vessel will depend upon the amount of foliage to be steamed and the size of the vessel. For a 1,600 litre vessel the grid is preferably positioned about 200 - 500 mm  
25 (usually about 300 mm) above the base of the sealed vessel.

The mesh size of the grid will depend upon the size of the foliage. In a preferred embodiment the foliage is chipped prior to being placed in the vessel to maximise the surface exposure of the foliage to the steam. In one  
30 embodiment of the invention the foliage is chipped to sizes of about 50 mm<sup>2</sup> to 75mm<sup>2</sup> and th mesh size of the grid is 50 mm<sup>2</sup>.

The foliage in the sealed vessel is subjected to steam for any suitable time such that the optimum amount of oil is extracted from the foliage. The time will be dependent on the size of the vessel, the quantity of foliage and the temperature and pressure of the steam. For example, for a 1600 litre capacity sealed vessel holding 0.5 tonne of foliage the foliage is generally steamed for two to three hours at a temperature of 100°C.

After the steam has passed through the foliage and the oil has been extracted therefrom the steam is collected. Preferably the sealed vessel is provided with an outlet in the top or an upper side wall through which the steam may pass and be collected.

Following collection of the steam it is then necessary for the steam to be cooled to form an oil phase and an aqueous antimicrobial composition. This may be achieved by any suitable means, for example it may be achieved by passing the collected steam through a standard condenser.

On cooling of the steam it forms two immiscible phases, an oil phase which forms an upper layer and an aqueous antimicrobial composition which forms a lower layer. The oil phase may be separated from the antimicrobial composition by any suitable means. In a basic system the oil phase is simply skimmed or decanted from the top of the antimicrobial composition. Alternatively the oil phase may be drained from the top of the antimicrobial composition or the antimicrobial composition may be drained from the bottom of the container in which the two immiscible phases were collected.

The antimicrobial composition prepared by the above method has been found to be very effective with killing or preventing the growth of a wide range of microorganisms. For example, the antimicrobial composition has been used in the treatment of viral, bacterial and fungal infections in mammals including both humans and domestic pets.

In particular the antimicrobial composition has been found to be effective in the treatment of viral infections such as parvovirus and herpes. It has also been found to be effective in the treatment of fungal infections such as ringworm or tinea. In addition, it has also been found to be effective in the treatment of  
5 bacterial infections such as Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Legionella pneumophila and acne.

Any suitable amount of the antimicrobial composition may be used to prevent the growth of or kill microorganisms. The preferred amount of antimicrobial  
10 composition to be used will depend on the method of application and the number and type of microorganisms.

In a preferred embodiment of the invention the antimicrobial composition as prepared by the process is directly applied to a microorganism. This may be  
15 achieved by directly dabbing the area of infection with enough composition to form a thin layer thereover.

In other embodiments of the invention the antimicrobial composition may be used as a preventive composition by directly applying the composition to a cut  
20 or abrasion.

In yet another embodiment of the invention the antimicrobial composition may be used as a relief composition by directly applying the composition to a painful site, such as an insect bite or sting, sunburn or other burns and as an after  
25 body waxing lotion.

Those skilled in the art will appreciate that the antimicrobial composition may have many other uses and that the above examples should be read as only  
30 some examples of uses for the composition.

The effectiveness of the antimicrobial composition will now be described with reference to some particular examples. However, it should be understood that

the use of the composition is not limited to the treatment of the microorganisms referred to therein.

### Example 1

5

#### Test Procedure:

The relative efficacy of the antimicrobial composition was compared with a known effective disinfectant, 2.5% gluteraldehyde and a distilled water control.

### 10 Materials and Methods

#### Materials:

Product: Antimicrobial composition prepared by the method of the invention.

Virus: Canine Parvovirus, strain DV 1333-4 obtained from  
15 Prof. Margaret Sabine, University of Sydney.

#### Virus Indicator

System: FK continuous cell line/pig red blood cells (PRBC)

Artificial soil: 10 per cent Foetal Bovine Serum (FBS)

#### Disinfectant

20 Inactivator System: Amrad-Pharmacia Dextran 2000 Blue Chromatography

#### Method

Product and controls were mixed 50:50 with virus suspension in culture medium containing 10% FBS at room temperature. At 10 and 30 minutes, samples were  
25 taken and passed through a column of Dextran 2000 Blue to remove residual disinfectant. Ten-fold dilutions were made and inoculated into FK cells to titrate surviving viruses. After 5 days incubation, virus end-points were determined by the presence/absence of haemagglutination of PRBC. Virus titres were calculated by the method of Reed and Muench and the relative efficacy of the  
30 different test preparations determined. A 4 log<sub>10</sub> reduction or better is required for a disinfectant claim to be made. This may be reduced to a 3 log<sub>10</sub> reduction



were the virus indicator/inactivation system does not enable a 4 log<sub>10</sub> reduction to be demonstrated.

### Results

5		Virus titre, log <sub>10</sub>	% kill
	Water control	6.00	-
	2.5% Gluteraldehyde (10 min)	<2.40	>99.97
10	(30 min)	<2.40	>99.97
	Product (10 min)	5.40	75.00
	(30 min)	4.84	93.00
	< = less than      > = greater than		

15

### Comments

There was a reduction in the virus titre brought about by the antimicrobial composition. This was a 0.60 log<sub>10</sub> (75%) reduction at 10 minutes and a 1.16 log<sub>10</sub> (93%) at 30 minutes. To make a disinfectant claim, there should be a 3-4 log<sub>10</sub> (99.9 - 99.99%) reduction in 10 minutes. This was observed with the gluteraldehyde positive control.

20

### Example 2

25 Test organisms: The organisms used in this example were:  
Escherichia coli NCTC 8196  
Staphylococcus aureus NCTC 4168  
MRSA: hospital strain resistant to penicillin, ampicillin,  
cephalosporin, tetracycline, gentamicin and streptomycin.

30

In culum

All inocula were 18 hour cultures with a cell density of approximately  $10^8$  cells/mL.

### Test Procedure

- 5 1. 0.1mL of each of the test organisms was inoculated into:
  - (i) 9.9mL antimicrobial composition
  - (ii) 9.9mL 0.1% peptone water (control).
2. Mixtures were incubated at 37°C throughout the test period.
- 10 3. Mixtures were sampled 0, 15, 30 and 60 minutes, in order to enumerate viable organisms. Serial dilutions were prepared in 0.1% peptone water, and 1mL aliquots used to prepare pour plates with Plate Count Agar. Colonies were counted after incubation at 37°C for 48 hours.

15

### Results

#### **S. aureus**

	Cell concentration $\log_{10}$	% kill
20 Control	5.8	-
<u>Product</u>		
15 min	5.2	75
30 min	0.6	99.999
25 60 min	ND*	>99.999

#### **MRSA**

	Cell concentration $\log_{10}$	% kill
30 Control	6.5	
15 min	<4	>99

9

	30 min	1	99.999
	60 min	ND*	>99.999
	<b>E. Coli</b>		
		Cell concentration	% kill
5		log <sub>10</sub>	
	Control	6.6	
	<hr/>		
	15 min	5.1	97
	30 min	3.7	99.9
10	60 min	ND*	>99.999

\*ND : Not detectable

#### Comments

Under the test conditions employed, the antimicrobial composition was responsible for a reduction in cell count of each of the three test organisms. At 15 minutes, this was a 75% reduction for *S. aureus*, a Gram-positive bacterium, >99% for the multi-resistant strain of *S. aureus* (MRSA) tested and 97% for *E. coli*, a Gram-positive bacterium. A 5-6 log<sub>10</sub> reduction was achieved for each of the test organisms after a contact time of 60 minutes with the antimicrobial composition.

Those skilled in the art will appreciate that there may be many variations and modifications of the process and compositions described herein which are within the scope of the present invention.

25

## CLAIMS:

1. A process for preparing an antimicrobial composition including:
  - a) supplying foliage from melaleuca (linerafolia) and/or melaleuca (alternafolia) plants to a sealed vessel,
  - b) passing steam through the foliage in the sealed vessel to extract oil therefrom and collecting the steam thereafter,
  - c) cooling the steam to form an oil phase and an aqueous antimicrobial composition, and
  - d) separating the oil phase from the antimicrobial composition.
2. A process according to claim 1 wherein steam is passed through the foliage for two to three hours.
3. A process according to claim 1 or claim 2 wherein steam is passed through the foliage at a minimum temperature of about 100°C.
4. An antimicrobial composition when prepared by the process of any one of claims 1 to 3.
5. An antimicrobial composition including the aqueous fraction collected following the steam distillation of the foliage of melaleuca plants.
6. A method of treating a microbial infection which includes administering an effective amount of the antimicrobial composition as defined by claim 4 or 5, to the site of the infection.

7. A method of treating a bacterial infection which includes administering an effective amount of the antimicrobial composition as defined by claim 4 or 5, to the site of the infection.
- 5 8. A method according to claim 7 wherein the antimicrobial composition is dabbed directly on to the site of infection to form a thin layer thereover.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/AU 97/00092

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
Int Cl <sup>6</sup> : A61K 35/78 A01N 65/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC <sup>6</sup> A61K 35/78 Chemical Abstracts, A01N 65/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Derwent WPAT, JPAT; Chemical Abstracts CASM; Medline		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,Y	Carson, C.F. and Riley, T.V. (1993) Antimicrobial activity of the essential oil of <i>Melaleuca alternifolia</i> , <i>Letters in Applied Microbiology</i> , vol. 16, 49-55. See "History" and "Production" sections in particular.	1-8
X,Y	Hayes, A.J. et al. (1993) Relationship between chemical composition and antimicrobial activity of Australian Tea Tree Oil, <i>Program and Abstracts of the Annual Scientific Meeting of the Australian Society for Microbiology, Perth, Western Australia</i> , 1993, Abstract P2.2, page A-4, Melbourne, Australia: Australian Society for Microbiology	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 27 March 1997		Date of mailing of the international search report 11 Apr 1997
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN INDUSTRIAL PROPERTY ORGANISATION PO BOX 200 WODEN ACT 2606 AUSTRALIA Facsimile N : (06) 285 3929		Authorized officer  D. Hennessy Telephone No.: (06) 283 2255

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/AU 97/00092

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Carson, C.F. and Riley T.V. (1994) The antimicrobial activity of tea tree oil, <i>Medical Journal of Australia</i> , Volume 160, 236. See whole article.	1-8
X,Y	Carson, C.F. and Riley, T.V. (1995) Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of <i>Melaleuca alternifolia</i> , <i>Journal of Applied Bacteriology</i> , volume 78, pages 264-269. See whole document.	1-8
Y	Raman, A. et al. (1995) Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staph. epidermidis</i> and <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Letters in Applied Microbiology</i> , vol. 21, 242-245.	1-8
Y	Beylier, M.F. et al. (1979) Bacteriostatic activity of some Australian essential oils, <i>Perfumer and Flavorist</i> , vol. 4, 23-25.	1-8
X,Y	JP 4-41407 A (Hiroyuki Koike) 12.02.92. See Patent Abstracts of Japan, C942, page 142.	1-8
X,Y	JP 4-112801 A (Kanifua Kemikaru K.K.) 14.04.92 See Patent Abstracts of Japan, C970, page 97	1-8
Y	US 5385733 A (Mankovitz) 31.01.95 See whole document	1-8
Y	AU 89443/91 A (Mankovitz) 30.04.92 See whole document.	1-8
P,Y	AU 35304/95 A (Hibberd) 04.04.96 See pages 4 and 5 in particular.	1-8
Y	WO 93/17558 (Whiteley) 16.09.93 See pages 9 and 10 in particular.	1-8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

## Information on patent family members

**PCT/AU 97/00092**

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

<b>Patent Document Cited in Search Report</b>	<b>Patent Family Member</b>
JP     4-41407	NONE
JP     4-112801	NONE
US     5385733	AU     89443/91               WO     92/06700               US     5215748 HU     71515
AU     89443/91	AU     89443/91               WO     92/06700               US     5215748 HU     71515
AU     35304/95	WO     96/09834               GB     2293547
WO     93/17558	AU     36228/93               EP     630182               JP     7506815 US     5610189





EPA/EPO/OEB  
D-80286 München  
+49 89 2399-0  
TX 523 656 epmu d  
FAX +49 89 2399-4465

Europäisches  
Patentamt

Eingangs-  
stelle

European  
Patent Office

Receiving  
Section

Office européen  
des brevets

Section de  
Dépôt

Doireau, Marc  
Cabinet Orès  
6, avenue de Messine  
75008 Paris  
FRANCE

CABINET ORES

04. NOV. 2002



Datum/Date

30-10-2002

Zeichen/Ref./Réf. ALif-C549/EP090	Anmeldung Nr./Application No./Demande n°/Patent Nr./Patent No./Brevet n°. 01936956.0-2110- PCT/JP0104929
Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Proprietor/Titulaire SAKAI, Takuo	

PROCEEDING FURTHER WITH THE EUROPEAN PATENT APPLICATION PURSUANT TO  
ARTICLE 96(1) AND RULE 51(1) EPC

A supplementary European search report has been drawn up concerning  
the above European patent application (publication no. 1209238).

Since you have filed a request for examination prior to the trans-  
mission of the supplementary European search report, you are hereby  
invited to indicate within

TWO MONTHS

of notification of this invitation whether you desire to proceed  
further with the European patent application.

If you do not indicate in due time that you desire to proceed further  
with the European patent application, it will be deemed to be withdrawn  
(Art. 96(3) EPC).

If you wish you may comment on the supplementary European search report  
and amend, where appropriate, the description, claims and drawings  
(Rule 51(1) EPC).

RECEIVING SECTION

Adams, Timothy



REGISTERED LETTER

EPO Form 1224 04.85

01936956.0 DMEX

7001007 22/10/02

..... M02

021





European Patent  
Office

SUPPLEMENTARY  
EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number  
EP 01 93 6956

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)
X	EP 0 609 779 A (FUKUNAGA TOSHIKAZU) 10 August 1994 (1994-08-10) * page 2, line 38 - line 45; examples 1-6; table 4 *	1,6-9	C12P1/00 A01N65/00
X	US 3 624 211 A (MEIFFREN MARCEL GEORGES) 30 November 1971 (1971-11-30) * column 1, line 1 - line 21; examples 1,2 *	1,7-9	
P,X	WO 01 07135 A (PISACANE ANTHONY) 1 February 2001 (2001-02-01) * the whole document *	1,7-9	
X	WO 97 30718 A (STACEY THOMAS KEITH) 28 August 1997 (1997-08-28) * the whole document *	1,7-9	
X	US 5 792 726 A (RINES CAROL M ET AL) 11 August 1998 (1998-08-11) * claims *	1,7-9	
X	EP 0 880 894 A (SATO NAOHIKO) 2 December 1998 (1998-12-02) * claims; examples *	1,7-9	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7) A01N
X	US 6 063 382 A (ARAI M ET AL) 16 May 2000 (2000-05-16) * column 2, line 38 - column 3, line 62 *	1,7-9	
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 21 October 2002	Examiner Donovan-Beermann, T
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS			
X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document		T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document	

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C04)



**ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT  
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.**

EP 01 93 6956

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

21-10-2002

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0609779	A	10-08-1994	JP	2566515 B2	25-12-1996
			JP	6227931 A	16-08-1994
			AT	171843 T	15-10-1998
			DE	69413725 D1	12-11-1998
			DE	69413725 T2	18-03-1999
			EP	0609779 A1	10-08-1994
			US	5468493 A	21-11-1995
US 3624211	A	30-11-1971	FR	1514942 A	01-03-1968
			BE	694794 A	31-07-1967
			CH	473530 A	15-06-1969
			DE	1642107 A1	22-04-1971
			ES	337453 A1	01-03-1968
			LU	53097 A1	02-05-1967
			NL	6703486 A ,B	04-09-1967
			NL	7311041 A	25-10-1973
WO 0107135	A	01-02-2001	GB	2352396 A	31-01-2001
			GB	2352397 A	31-01-2001
			AU	6172100 A	13-02-2001
			WO	0107135 A2	01-02-2001
WO 9730718	A	28-08-1997	AU	1713597 A	10-09-1997
			WO	9730718 A1	28-08-1997
US 5792726	A	11-08-1998	US	5434122 A	18-07-1995
			US	5276005 A	04-01-1994
			CA	2109650 A1	23-05-1995
			GB	2283741 A ,B	17-05-1995
EP 0880894	A	02-12-1998	JP	11043443 A	16-02-1999
			CA	2238559 A1	27-11-1998
			DE	69804895 D1	23-05-2002
			EP	0880894 A1	02-12-1998
US 6063382	A	16-05-2000	JP	10324610 A	08-12-1998



(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 12 月 27 日 (27.12.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/98519 A1

- (51) 国際特許分類: C12P 1/00, A01N 65/00 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/04929 (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (22) 国際出願日: 2001 年 6 月 11 日 (11.06.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2000-189614 2000 年 6 月 23 日 (23.06.2000) JP
- (71) 出願人 および (72) 発明者: 坂井拓夫 (SAKAI, Takuo) [JP/JP]; 〒590-0132 大阪府堺市原山台4丁13番6号 Osaka (JP). 添付公開書類: 国際調査報告書
- (74) 代理人: 野河信太郎 (NOGAWA, Shintaro); 〒530-0047 大阪府大阪市北区西天満5丁目1-3 南森町パークビル Osaka (JP). 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING PLANT-ORIGIN ANTIBACTERIAL SUBSTANCE

(54) 発明の名称: 植物由来抗菌物質の製造方法

(57) Abstract: A process for producing an antibacterial substance which comprises disintegrating at least a part of a plant tissue and releasing the antibacterial substance therefrom; and antibacterial or bacteriostatic compositions containing the antibacterial substance thus obtained as the active ingredient. By using the above process and compositions, the proliferation of spore-forming bacteria can be efficiently inhibited.

(57) 要約:

本発明によれば、植物体の組織の少なくとも一部を崩壊させて抗菌物質を遊離させることからなる植物由来の抗菌物質の製造方法、及びこの方法で得られた抗菌物質を有効成分として含有する殺菌又は静菌組成物が提供される。

上記方法及び組成物の使用により、芽胞菌の増殖を有効に阻止することができ。

WO 01/98519 A1





## 明 細 書

## 植物由来抗菌物質の製造方法

## 5 技術分野

本発明は、植物体の組織の少なくとも一部を崩壊させて抗菌物質を遊離させることからなる植物由来の抗菌物質の製造方法、及びこの方法で得られた抗菌物質を有効成分として含有する殺菌又は静菌組成物に関する。

10

## 背景技術

微生物、特に、芽胞を形成する細菌（芽胞菌）は、しばしば食物を汚染し大きな経済的被害をもたらす。加工食品等は芽胞菌が汚染する格好の対象物で、殺菌後に一個でも芽胞が残存すると容易に増殖して食品の

15 品質を著しく損傷する。

また、芽胞菌の中には、好気性のバチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) や嫌気性のクロストリジウム・ボツリナム (*Clostridium botulinum*) のように毒素（セレウス毒素、ボツリヌス毒素）を生産してヒトを死に至らしめるものが存在する。

20 したがって、芽胞菌防除は食品産業にとって解決すべき大きな課題となっているが、食品の原料である農作物には常に芽胞菌が存在し、それらの加工品の中に混入する 경우가少なくない。

その上、細菌の芽胞は、加熱、有機溶媒の添加、乾燥など、一般に細菌を死滅させる条件でも生存する。たとえば、それらは沸騰水中で 20 分

25 間放置しても死滅せず、水分 2% 以下の条件でも死滅することはない。

したがって、高温などで滅菌処理した食品でも、芽胞菌による汚染がしばしば見られる。さらに、芽胞は細胞に比べて小さいので、精密濾過のような除菌処理で除去できない場合が多く、これも芽胞菌の防除が困難な理由となっている。

- 5      こうしたことから、芽胞菌の増殖を阻止する物質が種々検討されているが、食品衛生上安全で有効な物質は見出されていない。

ところで、高等植物の組織は細胞の集合体で構成されており、この構成にペクチンが重要な役割を果たしている。ペクチンは、植物組織の中ではラムノガラクトランを介して細胞壁を構成するセルロースやヘミセル  
10      ロースと結合し、さらに、これらが、カルシウムなど 2 価の金属を介したキレート結合によって、重層構造の、いわゆるミドルラメラを構成して細胞を粘結し、組織を形成している。

この形態の不溶性ペクチンをプロトペクチンといい、プロトペクチンに作用してペクチン物質を遊離させる活性を持つ酵素はプロトペクチナーゼと総称されている(発酵と工業 : 37, 928-938, 1978; Agric. Biol.  
15      hem., 52, 1091- 1093, 1988 ; Agric. Biol. Chem., 53, 1213-1223, 1989 ; Agric. Biol. Chem., 54, 879-889, 1990 ; Eur. J. Biochem., 226, 285-291, 1994 ; Biosci. Biotech. Biochem., 58, 353-358, 1994)。植物組織にプロトペクチナーゼを作用させると、水溶性のペクチン物質の遊離とともに  
20      個々の細胞が単離される単細胞化が起こる。

#### 発明の開示

本発明者は、枯死した植物体は微生物によって容易に分解されるのに対し、生命活性のある植物体は、植物病原菌を例外にして、一般の微生物  
25      物には汚染されないことに着目し、その生物学的仕組みを研究した結果、

プロトペクチナーゼを植物体に作用させた際にペクチンとともにミドル  
ラメラから可溶化される物質が、微生物の増殖を阻害する性質を有する  
ことを見出し、この発明を完成した。

- したがって、本発明によれば、植物組織の少なくとも一部を崩壊させ  
5 て抗菌物質を遊離させることからなる植物由来の抗菌物質の製造方法、  
及びこの方法で得られた抗菌物質を有効成分として含有する殺菌又は静  
菌組成物が提供される。

#### 図面の簡単な説明

- 10 図1は、タマネギをプロトペクチナーゼ-S で処理した単細胞化上澄液  
のバチルス・サブチリスに対する増殖阻害テストの結果である。検定液  
を注入するホールの周辺に見られるハロが、増殖阻止を示している。

図2は、プロトペクチナーゼ-S で処理した植物抽出液のバチルス・サ  
ブチリスに対する増殖阻害テストの一例である。

15

#### 発明を実施するための最良の形態

- 本発明の方法が適用される植物体は、特に限定されず、双子葉植物及び  
単子葉植物などのいずれでもよい。双子葉植物としては、キンポウゲ目  
(スイレン、ボタン)、コショウ目(ドクダミ、コショウ)、ウリ目(ウリ、  
20 カボチャ、ヘチマ)、サボテン目(サボテン)、バラ目(サクラ、ナシ、マ  
メ、イチゴ、ビワ、クズ)、ミカン目(マンゴー、ミカン、レモン)、オオ  
バコ目(オオバコ)、セリ目(セリ、ミツバ、ニンジン)、キク目(フキ、タ  
ンポポ、ゴボウ、キクナ、ヨモギ)、ハナシノブ目(ジャガイモ、トウガ  
ラシ、タバコ、ゴマ、サツマイモ)、ケシ目(ケシ、ハクサイ、キャベツ、  
25 カブラ、アブラナ)、アオイ目(ワタ、オクラ)、単子葉植物としては、ユ

リ目(ユリ、ニンニク、タマネギ)、サトイモ目(サトイモ)、ヒガンバナ目(ネギ、ニラ)、アヤメ目(アヤメ、ハナショウブ)、ヤマノイモ目(ナガイモ、ヤマノイモ)、リュウゼツラン目(リュウゼツラン)、ラン目(ラン)、イネ目(イネ、ムギ、シバ、サトウキビ、トウモロコシ)などが挙げられる。  
5

これらの植物体は、地上茎、地下茎、葉、根、花、果実、種子、芽のいずれの部分であってもよく、例えばキャベツ、キクナ、ヨモギ、タンポポ、セリでは地上茎と葉、ジャガイモ、タマネギでは地下茎、サツマイモとニンジンでは根、ワタでは花、カボチャでは果実、マメでは若芽(もやし)の部分を使用することができる。  
10

また、植物体はそのまま用いてもよいし、適当な大きさに切断もしくは破碎して用いてもよい。しかし、植物組織を十分に崩壊させるには、適当な大きさ、例えば0.5~1cm程度の角に植物体を細断することが好ましく、この範囲より大きい場合には、ワーリングブレンダーのような機械的手法との組み合わせによって破碎してもよい。  
15

植物体は、植物細胞を単細胞化しうる酵素と攪拌下で処理されることによって、細胞間隙中に存在する抗菌物質を遊離する。

酵素は、プロトペクチンに作用してペクチン物質を遊離させることができるものであればよく、1種のみを使用でも、2種以上の組み合わせでの使用であってもよい。  
20

一例として、酵素は、プロトペクチナーゼ類、ポリメチルガラクトクロナーゼ類、ポリガラクトクロナーゼ類、アラビナーゼ類及びラムノガラクトクロナーゼ類が挙げられ、具体的にはプロトペクチナーゼ-F、プロトペクチナーゼ-S、プロトペクチナーゼ-L、プロトペクチナーゼ-T、  
25 プロトペクチナーゼ-C、プロトペクチナーゼ-N 又はポリメチルガラクト

ュロナーゼ-SX1 を用いることが好ましい。

処理条件は、酵素の種類及び植物体の種類や重量などによって適宜選択される。プロトペクチナーゼ又はポリメチルガラクトンナーゼを用いる場合には、植物体(湿量)10g 当たりに 1,500~15,000 単位、好ましくは 1,500~10,000 単位、さらに好ましくは 2,000~5,000 単位の酵素を添加して、30~40℃、好ましくは約 37℃で 1~10 時間処理される。

酵素と植物体は、pH2.0~10.0 の範囲、好ましくは pH7.0 の酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液、生理食塩水又は水中で処理することができ、特に酢酸緩衝液、リン酸緩衝液又はトリス塩酸緩衝液で処理することが好ましい。なお、植物体の重量が同程度であれば、その植物体が細断されているほど、短時間で抗菌物質が遊離される。

上記のような酵素処理後に得られた液体は、そのまま用いてもよく、また従来法による濾過と遠心分離で部分的に精製した上澄液、あるいは望ましい場合にはさらに濾過又は精製処理することによって液体又は固体の単離生成物とすることができる。

精製法としては、酵素処理液に含有される抗菌物質は、その由来原料によって構造が必ずしも同一ではないが、陽イオン交換樹脂、80%濃度の硫安を用いる硫安沈澱、デキストランゲル、ポリアクリルアミドゲル又はアガロースゲルによるゲル濾過など、通常用いられる種々の方法の一つ又は任意の組み合わせを利用することができる。

例えば、陽イオン交換樹脂をカラム法に用いる場合は、樹脂として CM-セルロース、Amberlite、CM-Sephadex、CM-TOYOPEARL を用いることができる。サツマイモをプロトペクチナーゼ-S で処理した抗菌物質含有液では、上澄液を、リン酸緩衝液(pH7.0)で緩衝化した CM- TOYOPEARL を充填したカラムに通塔して吸着させ、さらに 0.6M 食塩水溶液を通塔させて抗

菌物質を溶出し、分離することができる。

本発明者の試験によれば、上記の方法により得られる抗菌物質は、バチルス属及びクロストリジウム属に代表される芽胞菌に抗菌活性を有するほか、アスペルギルス(Aspergillus)属のコウジ菌にも抗菌活性を示す。

- 5 このことから、この抗菌物質は孢子の発芽形成を阻害するなどの作用によって、芽胞菌ならびにコウジ菌の増殖を抑制すると考えられる。

- したがって、本発明にかかる抗菌物質は、水性液剤、噴霧剤又は固形剤(粉末剤、顆粒剤)などの形態で殺菌又は静菌組成物として使用することができる。これらの剤形に用いられる担体としては、水、澱粉、小麦粉、ショ糖、ブドウ糖、乳糖、デキストリンなど当該分野で公知の担体  
10 が挙げられ、さらにペクチン、アルブミン、アラビナンなどを組成物に任意に添加してもよい。

- 本発明の抗菌物質は、上記のような適当な剤形で、任意に他の殺菌剤又は静菌剤と混合して、各種の食品、例えばパン、麺、餡、クッキー、  
15 清涼飲料、栄養飲料、ゼリー状菓子の製造工程、又は最終製品に混合又は噴霧することにより、食品の腐敗防止に用いることができる。また、他の分野の製品として、飼料、医薬部外品などの分野でも利用が可能である。

- このように、本発明にかかる抗菌物質は、野菜、果菜、薬草などとして古くから食用となってきた植物体を原料にして製造できるので、人体  
20 に悪影響を及ぼすことなく、食品に添加して芽胞菌を防除する手段として利用できる点で特筆される。

- さらに、本発明の製造方法及び抗菌物質の原料として利用される植物体の部分は限定されないため、規格外で商品にならなかった農産物や調理くずなどの有効利用を図ることができ、食品廃棄物による環境汚染の  
25

防止、新規商品の創出など、社会に貢献するところは極めて大きく、その経済効果は計り知れないものがある。

以下、実施例を挙げて説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

5

#### 実施例 1

タマネギ(地下茎部分) 10g (湿重) を 0.5~1cm 角に細断して 10 ml の 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 7) に懸濁し、これに、表 1 に記載の酵素 4,000 単位 (酵素の活性は、坂井の方法、Methods in Enzymology, Academic Press、  
10 161 巻、335~350 ページの記載によって測定した) を添加して 37℃ で 5 時間攪拌した。その結果、タマネギの組織は崩壊して、単細胞と細胞間隙物質を含んだ溶液が生成した。

この液体を 20 メッシュのナイロン製濾布で濾過して濾液を得、これを 2000g で 5 分間遠心分離し、不溶性物質を完全に除去して得られた上澄  
15 液の抗菌活性を円筒平板法 (抗生物質ハンドブック、市野一麿、室屋博共編、産業図書、181 ページ; 抗生物質大要、田中信男、中村昭四郎共著、(財) 東京大学出版会、24 ページ) の変法によって測定した。すなわち、この上澄液 50  $\mu$ l をバチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) の孢子を播種したポテトデキストロース寒天培地 (日水製薬株式会社製) の平  
20 板に作った直径 6 mm のホールに満たして 15℃ で 3 時間放置した後、37℃ で 24 時間保温してバチルス・サブチリスを増殖させ、ホールの周辺に形成した生育阻止円の直径を測定してバチルス・サブチリスに対する抗菌活性を検定した。

なお、阻止円の直径からホールの直径 6 mm を引いた値が 1cm の場合を  
25 1 単位とし、酵素のみのもの及び緩衝液のみのものを対照として活性を算

出した。

この実験の結果を表 1 に示す。

表 1

5

使用酵素	抗菌活性 (単位/ml)
プロトペクチナーゼ-F <sup>1)</sup>	43.0
プロトペクチナーゼ-S <sup>1)</sup>	44.2
ポリメチルガラクトースナーゼ-S X1 <sup>2)</sup>	41.0
プロトペクチナーゼ-L <sup>1)</sup>	44.3
プロトペクチナーゼ-T <sup>3)</sup>	21.3
プロトペクチナーゼ-N <sup>4)</sup>	45.1
対照	0

1) T. Sakai, Methods in Enzymology, Vol. 161, 335-350, 1988, Academic Press.

2) T. Sakai ら, FEBS Letters, Vol. 414, 439-443, 1997.

10 3) M. Sakamoto ら, Eur. J. Biochem., Vol. 226, 285-291, 1994.

4) T. Sakai ら, Adv. Appl. Microbiol., Vol. 36, 213-294, 1993.

対照では、ホールのすぐ周囲にバチルス・サブチリスが生育していたが、酵素処理した上澄液を加えたホールの周囲では菌が生育しておらず、  
15 上澄液が、いずれも著しい抗菌活性を有することが認められた。したがって、この方法でタマネギからバチルス・サブチリスの生育を阻止する物質を製造できることが明らかである (図 1 参照)。

## 実施例 2

プロトペクチナーゼ-S (500 単位) を含む pH7 の 100 mM 酢酸緩衝液 10ml  
20 に 0.5~1 cm 角に細断した種々の植物体 3g を懸濁し、37℃で 1 時間攪拌した。この処理液を実施例 1 に示す方法で遠心分離し、その上澄液のバチルス・サブチリスに対する抗菌活性を実施例 1 と同様な方法で検定



したところ、表2に示すように、すべての植物体に抗菌活性が認められた。

表2

5

使用植物(部分)	抗菌活性(単位/ml)
サツマイモ(根)	47.0
カボチャ(果実)	49.3
キャベツ(地上茎と葉)	61.2
キクナ(地上茎と葉)	34.0
ニンジン(根)	60.2
ジャガイモ(地下茎)	61.2
タマネギ(地下茎)	44.2
ヨモギ(地上茎と葉)	34.0
タンポポ(地上茎と葉)	18.1
セリ(地上茎と葉)	22.5
ワタ(花)	11.5
対照(酵素のみ)	0

この結果から、抗菌物質が広く植物体に存在することが明らかとなり、抗菌物質の原料として、種類及び部分を問わず植物を利用できることが明らかとなった(図2参照)。

### 10 実施例3

各種の植物体(使用部分は実施例2に同じ)を1~2 cm 角に細断して100 mM 酢酸緩衝液(pH7)に懸濁し、これを5℃でワーリングブレンダーを用いて完全に破碎し、遠心分離によって不溶物を除去して得た上澄液のバチルス・サブチリスに対する抗菌活性を、実施例1の方法で測定した。

15 その結果、表3に示すようにいずれの植物体にも抗菌活性が確認された。

表 3

使用植物	抗菌活性(単位/ml)
サツマイモ	7.0
カボチャ	5.3
キャベツ	11.2
キクナ	13.0
ニンジン	6.5
ジャガイモ	7.3
タマネギ	34.2
ヨモギ	24.2
対照(酵素のみ)	0

- このように、植物組織を酵素で崩壊させて得られる液体のみでなく、
- 5 機械的手法によって得られた植物体の破碎液も抗菌物質を含有することが立証された。

#### 実施例 4

- カボチャ(果実)とサツマイモ(根)からプロトペクチナーゼ-S を用いて
- 実施例 1 の方法で調製した抗菌物質含有液の活性を、表 4 に示す微生物
- 10 について検定した。

表 4

微生物	抗菌活性 (サツマイモ抽出液のバチルス・サブチリスに対する活性を 100 とする)	
	サツマイモ抽出液	カボチャ抽出液
バチルス・サブチリス IFO 3134 ( <i>Bacillus subtilis</i> IFO 3134 )	100	290
バチルス・セレウス IFO 3001 ( <i>Bacillus cereus</i> IFO 3001)	113	283
バチルス・アルペイ IFO 14175 ( <i>Bacillus alvei</i> IFO 14175)	110	300
バチルス・スフェリカス IFO 3528 ( <i>Bacillus sphaericus</i> IFO 3528)	98	267
バチルス・プミルス IFO 3030 ( <i>Bacillus pumilus</i> IFO 3030)	132	301
バチルス・メガテリウム AKU 212 ( <i>Bacillus megaterium</i> AKU 212)	121	305
バチルス・アミロリクエファシエンス IFO 14141 ( <i>Bacillus amyloliquefacience</i> IFO 14141)	30	51
バチルス・サーキュランス IFO 3329 ( <i>Bacillus circulans</i> IFO 33239)	32	48
バチルス・コアグラランス IFO 12583 ( <i>Bacillus coagulans</i> IFO 12583)	30	56
バチルス・ファームス IFO 3330 ( <i>Bacillus firms</i> IFO 3330)	38	55
バチルス・リケニフォルミス IFO 14206 ( <i>Bacillus licheniformis</i> IFO 14206)	28	42
バチルス・マセラランス IFO 3490 ( <i>Bacillus macerans</i> IFO 3490)	42	68
バチルス・ナットウ IFO 3013 ( <i>Bacillus natto</i> IFO 3013)	56	80
クロストリジウム・アセトブチリクム ATCC 3625 ( <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 3625)	81	230
アスペルギルス・アワモリ IFO 4033 ( <i>Aspergillus awamori</i> IFO 4033)	11	25

表 4 から明らかなように、本法で製造した抗菌物質はバチルス・サブチリスのみならず、広くバチルス属細菌の増殖を阻害するとともに、ア

スベルギルス属細菌の増殖を阻害し、抗菌剤としての利用が可能であることが明確になった。

#### 実施例 5

約 1cm 角の立方体に細断したサツマイモ 900 g を 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7) に懸濁し、200,000 単位のプロトペクチナーゼ-S を添加して攪拌しつつ 37℃ で 5 時間反応させたところ、サツマイモの組織は完全に崩壊して単細胞と細胞間液を生成した。

処理液中の単細胞を実施例 1 に準じて除去し、60,000 単位の抗菌物質を含有する上澄液を得た。

#### 10 実施例 6

ブラックマッペのもやし 1kg を約 5mm の長さに裁断し、2% の食塩を含む 100mmol のトリス塩酸緩衝液 (pH7.0) に懸濁し、5g (115000 国際単位) のプロトペクチナーゼ (合同酒精株式会社製、Pectinase-GODO) を添加して溶解し、37℃ で攪拌しながら 6 時間反応させた。反応後、ナイロンメッシュで濾過して細胞残渣を除去し、濾液を 21,000g で 20 分間遠心分離した。この上澄液には 10 単位/ml の抗菌活性がみられた。

この溶液に、ペクチン、ブタ血清アルブミン、デキストリン、アラビナンあるいは可溶性デンプン (バレイショ) をいずれの場合も終末 0.5% になるよう添加して、10 日間 10℃ で静置して保存した後、溶液中の抗菌活性を測定したところ、表 5 に示す結果を得た。

このように、種々の物質を添加することによっても安定な抗菌物質含有液が得られた。

表 5

添加物	抗菌活性(単位/ml)
無添加(対照)	8.0
ペクチン	10.0
ブタ血清アルブミン	10.0
デキストリン	9.5
アラビナン	10.0
可溶性デンプン	10.0

実施例 7

- 5 実施例 6 で得た上澄液 10ml に終末 5% になるようにデキストリンを添加して溶解させた。この溶液を凍結乾燥させて粉末状の抗菌組成物を製造した。

この組成物を 2% 濃度の食塩水に溶解し、抗菌活性を測定したところ 5.5 単位/g であり、抗菌活性を固体の形態でも維持できることが確認さ

- 10 れた。

実施例 8

実施例 6 で得た上澄液 10ml に終末 5% になるように可溶性デンプン (バレイショ) を添加して十分攪拌した後、10℃ 以下に保ちながら減圧乾燥した。

- 15 こうして得られた固体粉末を 2% 濃度の食塩水に溶解し、生じる沈澱を除去した上清中の抗菌活性を測定したところ、固体粉末 1g 当たり 5 単位の抗菌活性が認められた。

このように、可溶性デンプンを用いて、固体の形態で抗菌組成物を製造することができた。

- 20

本発明によれば、植物体の組織の少なくとも一部を崩壊させて抗菌物

質を遊離させることからなる植物由来の抗菌物質の製造方法、及びこの方法で得られた抗菌物質を有効成分として含有する殺菌又は静菌組成物が提供される。

- 5 この抗菌物質は、特に、従来困難であった芽胞菌の汚染を防御することができる。また、抗菌物質の原料として、種類や部分を問わず、広く植物体を利用できるので、安全な抗菌物質を経済的に得ることができる。

## 請求の範囲

1. 植物体を適当な大きさに切断もしくは破碎するかせずして、植物組織の少なくとも一部を崩壊させて抗菌物質を遊離させることからなる、
- 5 植物由来の抗菌物質の製造方法。
2. 植物組織の崩壊が、プロトペクチンに作用してペクチン物質を遊離させうる酵素によって行われる請求項 1 に記載の方法。
3. 前記酵素が、プロトペクチナーゼ類、ポリメチルガラクトクロナーゼ類、ポリガラクトクロナーゼ類、アラビナーゼ類及びラムノガラクト
- 10 ュロナーゼ類からなる群から選択される請求項 2 に記載の方法。
4. 前記酵素が、プロトペクチナーゼ F、S、L、T、C もしくは N またはポリメチルガラクトクロナーゼ-SX1 である請求項 2 又は 3 に記載の方法。
5. 前記酵素が、pH2.0~10.0 の領域で 30~40℃ で用いられる請求項
- 15 2~4 のいずれか 1 つに記載の方法。
6. 植物体が、キャベツ、キクナ、ヨモギ、タンポポ、セリ、ジャガイモ、タマネギ、サツマイモ、ニンジン、ワタ及びカボチャからなる群から選択される請求項 1~5 のいずれか 1 つに記載の方法。
7. 請求項 1 による抗菌物質を有効成分として含有する殺菌又は静菌
- 20 組成物。
8. 食品に使用される請求項 7 に記載の組成物。
9. 食品がパン、麺、餡、クッキー、清涼飲料、栄養飲料又はゼリーである請求項 8 に記載の組成物。





図 1

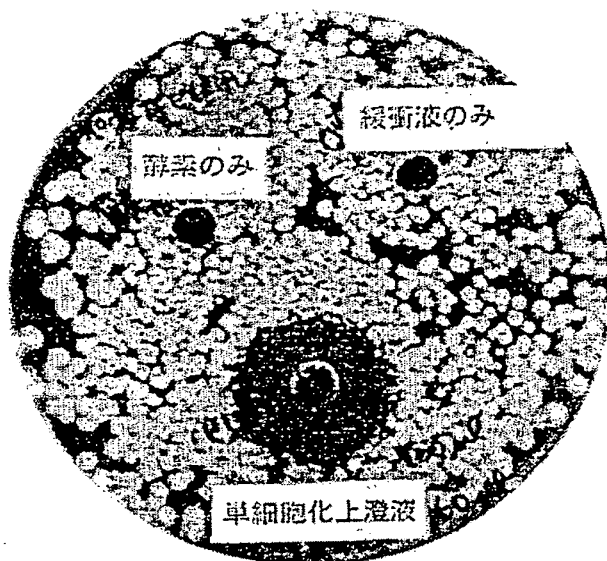
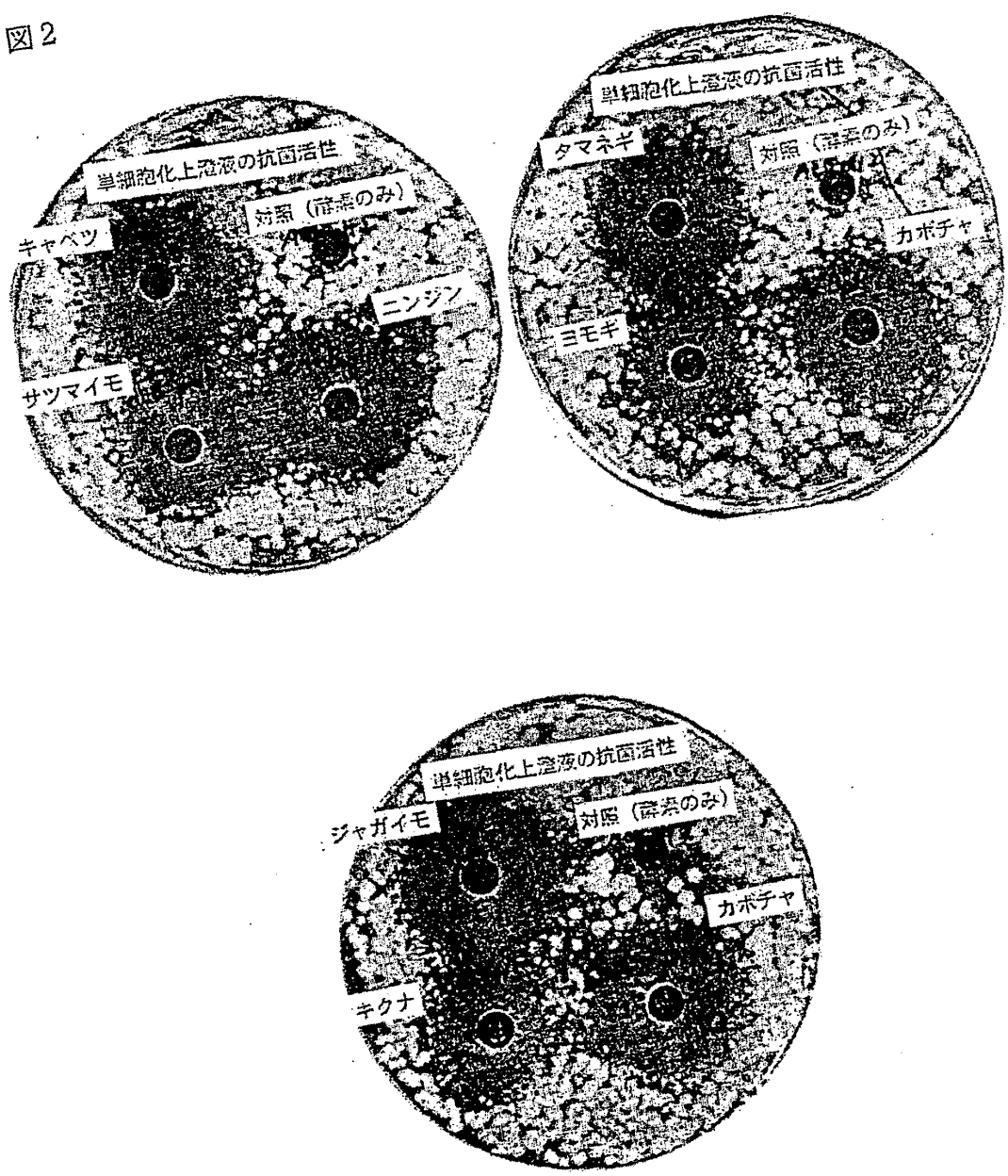




図 2





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04929

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12P1/00, A01N65/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12P1/00, A01N65/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	YAMADA Yasumasa et al., "Identification of Kaempferol from the Leaves of <i>Diospyros kaki</i> and its Antimicrobial Activity against <i>Streptococcus mutans</i> ", Biocontrol Science, (1999), Vol.4, No.2, pages 97 to 100	1, 7-9 2-6
A	NAKAMURA Takashi et al., "Emzymatic maceration of vegetables with protopectinase", Journal of Food Science, (1995), Vol.60, No.3, pages 468 to 472	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
04 July, 2001 (04.07.01)Date of mailing of the international search report  
17 July, 2001 (17.07.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



1

2

3

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12P1/00, A01N65/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12P1/00, A01N65/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), JICSTファイル(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	YAMADA Yasumasa et al., Identification of Kaempferol from the Leaves of <i>Diospyros kaki</i> and its Antimicrobial Activity against <i>Streptococcus mutans</i> ., Biocontrol Science, 1999, Vol. 4, No. 2, p. 97-100	1, 7-9/2-6
A	NAKAMURA Takashi et al., Enzymatic maceration of vegetables with protopectinase. Journal of Food Science, 1995, Vol. 60, No. 3, p. 468-472	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.07.01

国際調査報告の発送日

17.07.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

光本 美奈子

4B 2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



1  
2  
3

4  
5  
6